

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

 **BLACK BORDERS**

- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

## **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ Patentschrift  
⑯ DE 3543123 C2

⑯ Int. Cl. 5:  
G 01 N 24/08

⑯ Aktenzeichen: P 35 43 123.7-33  
⑯ Anmeldetag: 6. 12. 85  
⑯ Offenlegungstag: 11. 6. 87  
⑯ Veröffentlichungstag der Patenterteilung: 3. 5. 90

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑯ Patentinhaber:  
Spectrospin AG, Fällanden, Zürich, CH  
⑯ Vertreter:  
Kohler, R., Dipl.-Phys.; Schwindling, H., Dipl.-Phys.;  
Rüdel, D., Dipl.-Ing. Dipl.-Wirtsch.-Ing.  
Pat.-Anwälte, 7000 Stuttgart

⑯ Erfinder:  
SØrensen, Ole W., Zürich, CH  
⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:  
DE-OS 31 43 625  
Journal of Magnetic Resonance, Bd. 44, 1981,  
S. 542-561;  
Journal of the American Chemical Society, Bd. 107,  
Nr. 22, 30. Oktober 1985, S. 6394-6396;

⑯ Verfahren zur Aufnahme der Kernspinresonanzspektren von molekularen Spinsystemen

DE 3543123 C2

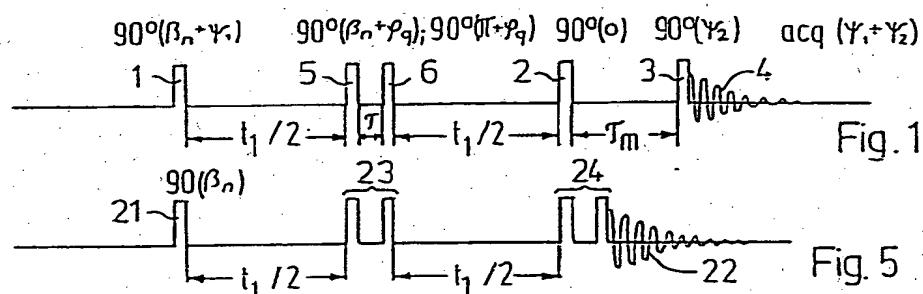


Fig. 1

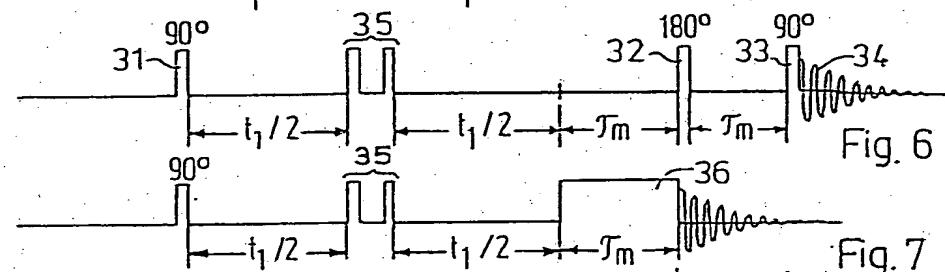


Fig. 5

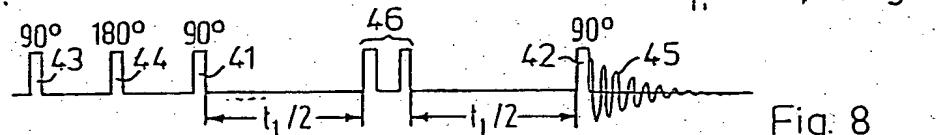


Fig. 6

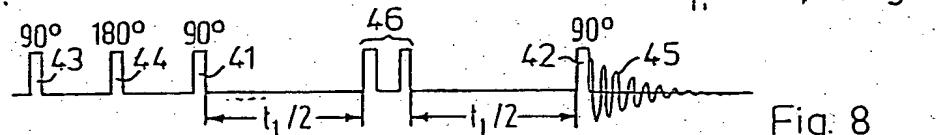
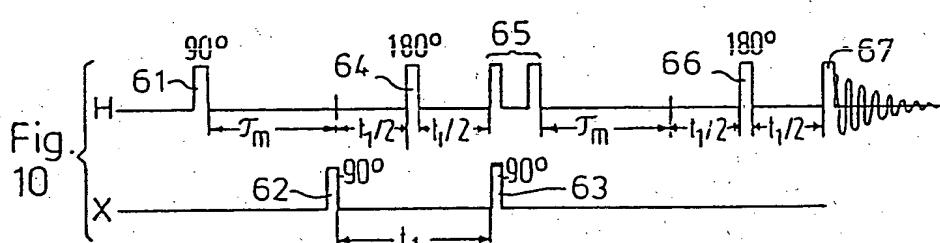
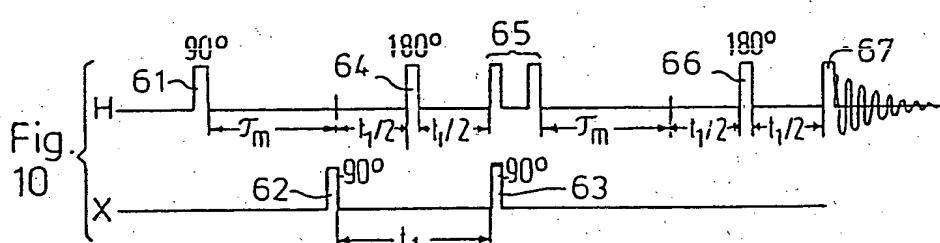
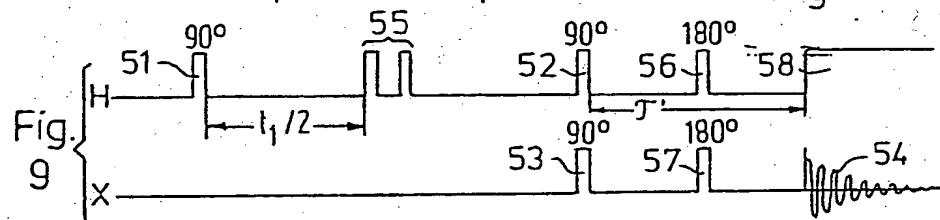
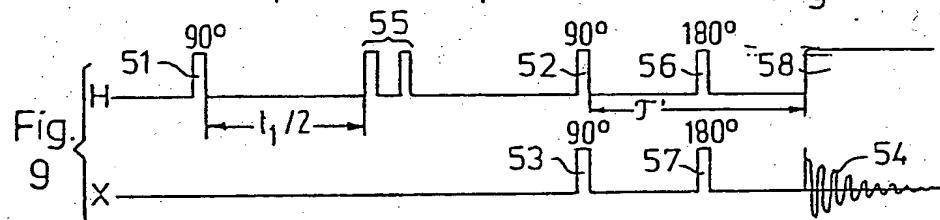


Fig. 7



# DE 35 43 123 C2

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufnahme der Kernspinresonanzspektren von molekularen Spinsystemen, zwischen denen eine Wechselwirkung stattfindet, bei dem die Spinsysteme durch einen  $90^\circ$ -Impuls angeregt werden und die Beobachtung der Resonanzsignale der angeregten Spinsysteme erst nach Ablauf einer auf den  $90^\circ$ -Impuls folgenden Entwicklungszeit  $t_1$  stattfindet.

Ein solches Verfahren ist sowohl aus der DE-OS 31 43 625 als auch aus der Publikation von Bax u. Freeman in J. Magn. Reson., Band 44, 1981, S. 542—561, als auch aus der Publikation von Griesinger, Sorensen u. Ernst in J. Am. Chem. Soc., Band 107, Nr. 22, 1985, S. 6394—6396 bekannt.

Zwischen den Spins komplizierter Moleküle finden häufig Kopplungen statt, die zu einer Aufspaltung der Linien eines Kernspinresonanzspektrums, kurz NMR-Spektrums, führen. Obwohl eine solche Linienaufspaltung wertvolle Informationen über die vorhandenen Kopplungen und damit über den Molekülaufbau liefert, kann sie andererseits die Analyse eines Spektrums stark erschweren, weil sich die durch eine Linienaufspaltung entstehenden Multipletts überlappen können, so daß die Zuordnung der einzelnen Linien nicht mehr ohne weiteres möglich ist. Bei der 2D-Spektroskopie entstehen durch Wechselwirkungen die sog. Kreuzlinien. Die Interpretation des Spektrums ist in hohem Maße erschwert, wenn sich Gruppen von Kreuzlinien überlappen. Es sind zwar verschiedene Verfahren bekannt, um aus 2D-Spektren durch Kopplung bedingte, störende Linien zu eliminieren, wie z. B. aus der DE-OS 31 43 625, jedoch war es bisher nicht möglich, die während der Entwicklungszeit  $t_1$  eintretenden Wirkungen einer skalaren Spin-Spin-Kopplung allgemein zu eliminieren, d. h. eine homonukleare Entkopplung in Richtung der  $\omega_1$ -Frequenzachse zu erzielen. Zwar ermöglicht das von Bax und Freeman in J. Magn. Reson., Band 44, 1981, S. 542—561 beschriebene Konstantzeit-Experiment eine Entkopplung, jedoch leidet dieses Verfahren an einer starken Abhängigkeit der Signalintensitäten von den Relaxationszeiten und den J-Kopplungskonstanten. Auch das aus J. Am. Chem. Soc., Band 107, Nr. 22, 1985, S. 6394—6396 bekannte zweidimensionale Verfahren eliminiert störende Multiplettlinien in zweidimensionalen Kreuzsignalen. Dabei werden Resonanzsignale, die mit verschiedenen Weiten des Flipwinkels eines Mischpulses oder mit verschiedenen Phasenwinkeln der HF-Schwingung von Anregungsimpulsen aufgenommen werden, miteinander kombiniert. Dieses Verfahren führt allerdings im Gegensatz zum erfundungsgemäßen Verfahren nicht zu einer Reduktion der frequenzmäßigen Ausdehnung der Signale in  $\omega_1$ .

Der Erfindung liegt demnach die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Aufnahme von Kernspinresonanzspektren von molekularen Spinsystemen anzugeben, das es ermöglicht, die bei Vorliegen einer J-Kopplung infolge der skalaren Spin-Spin-Wechselwirkungen stattfindenden Entwicklungen zu refokussieren und dadurch die während der Entwicklungszeit  $t_1$  eintretenden Wirkungen der skalaren Spin-Spin-Kopplungen zu eliminieren.

Diese Aufgabe wird nach der Erfindung dadurch gelöst, daß das Spinsystem nach Ablauf der halben Entwicklungszeit  $t_1/2$  mit einem Zeitumkehr-Impuls bestrahlt wird, der eine Drehung der Spinnmomente um einen Flipwinkel  $\beta_n$  bewirkt und dessen HF-Schwingung gegenüber einer Referenzphasenlage eine Phasenverschiebung  $\varphi_q$  aufweist, wogegen die HF-Schwingung des dem Zeitumkehr-Impuls vorausgehenden  $90^\circ$ -Impulses oder auch weiterer vor dem Zeitumkehr-Impuls verwendeter HF-Anregungsimpulse gegenüber der Referenzphasenlage eine Phasenverschiebung um einen Winkel  $\psi + \beta_n$  aufweist, in dem  $\psi$  entweder 0 oder  $\pi$  bedeutet und  $\beta_n$  mit dem Flipwinkel des Zeitumkehr-Impulses übereinstimmt und durch die maximale Anzahl  $N$  der im Spinsystem miteinander gekoppelten Spins gemäß der Gleichung

$$\beta_n = n \frac{\pi}{N}$$

mit  $n = 0, 1, 2, \dots, N-1, N+1, \dots, 2N-1$  bestimmt ist, wogegen  $\varphi_q$  unabhängig von  $\beta_n$  nacheinander einen der Werte

$$\varphi_q = q \frac{2\pi}{3}$$

mit  $q = 0, 1, 2$  annimmt, daß aufgrund von  $3(2N-1)$  Anregungen Resonanzsignale  $s_{nq}$  für jeden Wert von  $\beta_n$  und  $\varphi_q$  aufgenommen werden, und daß diese Resonanzsignale  $s_{nq}$  mit einem Gewichtungsfaktor

$$W_n = \frac{1}{2} \tilde{B}_n + \sum_{p=1}^K \tilde{B}_p \cos(p\beta_n) - \frac{1}{4} \tilde{B}_K \cos(K\beta_n) \delta K, N$$

multipliziert und einem resultierenden Signal

$$S = \sum_{n=0}^{2N-1} \left( W_n \cdot \sum_{q=0}^2 s_{nq} \right)$$

addiert werden, wobei der Gewichtungsfaktor  $W_n$  die Fourier-Transformierte der Faktoren

$$B_p = \frac{(-1)^p}{12} \left( 3p^2 - K^2 - \frac{1}{2} \right)$$

ist, in denen  $K$  die höchste Anzahl der tatsächlich im Spinsystem vorkommenden Kopplungen angibt und  $p$  eine sich zwischen 0 und  $K$  fortlaufend ändernde, ganze Zahl ist, weshalb gilt:

$$B_0 = \frac{-(2K^2 + 1)}{24} \text{ und } B_K = (-1) \frac{K(4K^2 - 1)}{24},$$

während  $\delta_{K,N}$  den Wert 1 hat, wenn  $N = K$ , und sonst null ist.

Bei dem erfundungsgemäßen Verfahren werden also statt der sonst üblichen einfachen Induktionssignale durch Aufsummieren einer Anzahl nach dem erfundungsgemäßen Verfahren erzeugter, unterschiedlicher Signale gebildete Signale  $S$  verwendet, die sich aus der folgenden Gleichung ergeben

$$S = \sum_{n=0}^{2N-1} \left( W_n \cdot \sum_{q=0}^2 s_{nq} \right),$$

in der  $s_{nq}$  die durch Variation von  $n$  und  $q$  gewonnenen, einzelnen Induktionssignale sind.

Das erfundungsgemäße Verfahren bewirkt eine zeitliche Umkehr der Entwicklung, die infolge einer skalaren Spin-Spin-Kopplung stattfindet, mit dem Ergebnis einer homonuklearen Entkopplung, die frei von den Nachteilen des Konstantzeit-Experimentes ist. Das Prinzip beruht auf den verschiedenen Abhängigkeiten der verschiedenen Kohärenz-Übertragungswege von dem Drehwinkel  $\beta_n$  einer Zeitumkehrdrehung, die an einem geeigneten Ort eingeführt wird. Der Zeitumkehr-Impuls, der im folgenden auch kurz TR-Impuls (time reversal) oder auch TR-Element genannt wird, bewirkt eine einzigartige Auswahl jener Übertragungswege, welche eine zeitliche Umkehr der durch die J-Kopplung bedingten Entwicklung zur Folge haben.

Die Bedingungen für eine Zeitumkehr können leicht in Form der Spinmultiplett-Komponenten, ausgedrückt als Produkt-Operatoren, angegeben werden. Beispielsweise bezeichnet

$I_1^* I_2 I_3^*$

eine Kohärenz des Spins  $I_1$  mit den Kopplungspartnern  $I_2$  und  $I_3$  in ihren  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Zuständen. Eine zeitliche Umkehr der J-Entwicklung findet statt, wenn durch das angegebene Verfahren alle passiven Spins ( $I_2$ ,  $I_3$ ) umgekehrt werden, während der aktive Spin ( $I_1$ ) unbeeinflusst bleibt, also

$I_1^* I_2^* I_3$

übergeht in

$I_1^* I_2 I_3^*$

Es gibt keine einzige, nicht selektive Drehung, welche diese Forderung erfüllt. Jedoch hat das erfundungsgemäße Verfahren die gewünschte Wirkung, weil dabei Signale miteinander kombiniert werden, welche durch Verwendung eines TR-Impulses mit variablem Drehwinkel  $\beta_n$  erhalten werden, wobei in dem oben angegebenen Fall eine Abhängigkeit von  $\beta_n$  besteht, die durch  $\cos^2(\beta_n/2) \sin^4(\beta_n/2)$  gegeben ist.

Insofern steht das Prinzip des erfundungsgemäßen Verfahrens in einer gewissen Beziehung zu der sog. E. Cosy-Technik, wie sie aus J. Am. Chem. Soc., Band 107, Nr. 22, 1985, S. 6394–6396 bekannt ist.

Obwohl das erfundungsgemäße Verfahren besondere Bedeutung für homonukleare Spin-Spin-Entkopplung (J-Entkopplung) bei der Aufnahme von 2D-Spektrogrammen hat, hat es auch allgemeine Bedeutung für die zeitliche Umkehr der durch J-Kopplungen bedingten Entwicklungen und damit die Eliminierung von störenden J-bedingten Signaldämpfungen. Das erfundungsgemäße Verfahren ist in vielfältiger Weise bei der Untersuchung von biologischen Makromolekülen mittels der NMR-Spektroskopie anwendbar, wo sonst konventionelle NMR-Spektren Bereiche mit einer starken Überlappung der Resonanzen aufweisen. Die Beseitigung der Multiplett-Aufspaltungen, d. h. eine Refokussierung der J-Entwicklungen, kann eine solche Überlappung beseitigen und daher neu spektrale Bereiche für eine Interpretation zugänglich machen. Verwendungsmöglichkeiten bestehen auch bei heteronuklearen Spinsystemen und allgemein in der 2D-Austausch-Spektroskopie. Gleichfalls kann das Verfahren bei der Mehrquantenspektroskopie und bei indirekter Beobachtung der Kernspinresonanz Verwendung finden.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäßen Verfahrens wird der Zeitumkehr- oder TR-Impuls aus zwei Abschnitten zusammengesetzt, nämlich aus einem ersten Abschnitt in Form eines  $90^\circ$ -Impulses mit der Phase  $\beta_n + \varphi_q$  und aus einem dem ersten Abschnitt falls gerätebedingt erforderlich mit einem gegenüber der Entwicklungzeit kurzen, zeitlichen Abstand  $\tau$ , der ausschließlich der Phaseneinstellung dient, folgenden zweiten Abschnitt in Form eines  $90^\circ$ -Impulses mit der Phase  $\pi + \varphi_q$ . Dabei ist  $\tau$  die Zeit, die benötigt wird, um die HF-Phase zu ändern. Ein typischer Wert für  $\tau$  ist  $5 \cdot 10^{-6}$  s. Die Realisierung des TR-Impulses mittels zweier Abschnitte in Form von  $90^\circ$ -Impulsen mit unterschiedlichen Phasenlagen ist mit herkömmlichen NMR-Spektrometern genauer als die Erzeugung eines Impulses, der aufgrund seines Energieinhaltes einen

90° verschiedenen, vorgegebenen Drehwinkel  $\beta_n$  bewirken soll.

Wie bereits erwähnt, ist das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere für die Verwendung bei der Aufnahme von 2D-Spektren geeignet. Demgemäß sieht eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens die Verwendung von zur Aufnahme von zweidimensionalen Kernspinresonanzspektren geeigneten

5 Impulsfolgen vor, in die der Zeitumkehr-Impuls eingefügt ist und bei denen die Phase der HF-Schwingung der dem Zeitumkehr-Impuls vorausgehenden Anregungsimpulse um den Winkel  $\beta_n$  verschoben ist. So kann beispielweise für NOESY-Experimente (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) die Impulsfolge

$$10 \quad 90^\circ(\beta_n + \psi_1) - \frac{1}{2}t_1 - 90^\circ(\beta_n + \varphi_g) - \tau - 90^\circ(\pi + \varphi_g) - \frac{1}{2}t_1 - 90^\circ(0) - \tau_m - 90^\circ(\psi_2) - \text{acq.}(\psi_1 + \psi_2)$$

Anwendung finden, bei der  $\psi_1$  und  $\psi_2$  in einem von  $\beta_n$  und  $\varphi_g$  unabhängigen zyklischen Wechsel die Phasenwinkel 0 und  $\pi$  bedeuten. Dies ergibt einen minimalen  $12(2N-1)$  Schritt Phasenzyklus.

15 Wird die Erfindung bei einem Verfahren zur Untersuchung von Spinsystemen mit heteronuklearer Kopplung verwendet, bei dem durch eine erste Impulsfolge eine erste Kernart unmittelbar angeregt und dann durch eine zweite Impulsfolge die durch Kopplung erfolgte Anregung einer zweiten Kernspinart abgefragt wird, so wird der Zeitumkehr-Impuls in die erste Impulsfolge eingefügt. Es versteht sich, daß auch hier wieder die entsprechende Phasenverschiebung der dem TR-Impuls vorangehenden Impulse stattfinden muß und die Experimente mit den nach der Erfindung vorgesehenen Änderungen der verschiedenen Winkel wiederholt und die erhaltenen 20 und mit dem angegebenen Gewichtungsfaktor multiplizierten Signale addiert werden müssen, um das von der Kopplung befreite Signal zu erhalten.

25 Eine indirekte Untersuchung von Spinsystemen mit heteronuklearer Kopplung kann in an sich bekannter Weise dadurch stattfinden, daß mittels einer ersten Impulsfolge eine erste Kernspinart und mittels einer zweiten Impulsfolge eine zweite Kernspinart angeregt wird, und zwar derart, daß ein einem ersten 90°-Impuls der ersten Impulsfolge folgender erster 180°-Impuls in die Mitte zwischen zwei 90°-Impulsen der zweiten Impulsfolge fällt. Bei einem solchen Verfahren wird die Erfindung dadurch angewendet, daß der Zeitumkehr-Impuls in die erste Impulsfolge an einer Stelle eingefügt wird, die zeitlich mit dem zweiten 90°-Impuls der zweiten Impulsfolge zusammenfällt, daß dem Zeitumkehrimpuls in der ersten Impulsfolge ein weiterer 180°-Impuls in einem zeitlichen Abstand folgt, der dem Abstand des ersten 180°-Impulses von dem ersten 90°-Impuls der ersten Impulsfolge gleich ist, und daß die Aufnahme des von der ersten Kernspinart gelieferten Resonanzsignals in einem zeitlichen Abstand vom weiteren 180°-Impuls beginnt, der dem zeitlichen Abstand des Zeitumkehr-Impulses von dem ersten 180°-Impuls gleich ist, so daß der Zeitumkehr-Impuls in die Mitte zwischen den ersten 90°-Impulsen der ersten Impulsfolge und den Beginn der Signalaufnahme fällt.

30 Weitere Einzelheiten und Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung der in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispiele. Es zeigt

35 Fig. 1 das Diagramm der für ein 2D-NESY-Experiment benötigten, nach der Erfindung modifizierten Impulsfolge.

Fig. 2 die Wiedergabe eines 2D-NOE-Spektrums von Decapeptid-LHRH.

40 Fig. 3 und 4 zwei Bereiche des in Fig. 2 dargestellten Spektrums in vergrößertem Maßstab jeweils ohne und mit Reversierung durch einen Zeitumkehr-Impuls und

45 Fig. 5 bis 10 weitere Diagramme von nach der Erfindung modifizierten Impulsfolgen.

Fig. 1 zeigt das Diagramm einer Impulsfolge, wie sie in der 2D-NOE-Spektroskopie Anwendung findet. Typisch für diese Impulsfolge sind drei 90°-Impulse 1, 2, 3, von denen der erste 90°-Impuls 1 das Spinsystem der zu untersuchenden Probe anregt, der zweite 90°-Impuls nach einer Entwicklungszeit  $t_1$  die Anregung wiederholt, um den Einfluß von Spin-Spin-Kopplungen festzustellen, während der dritte 90°-Impuls 3 eine Mischzeit  $\tau_m$  beendet, die sich an den zweiten 90°-Impuls 2 anschließt. Im Anschluß an den dritten 90°-Impuls wird das Resonanzsignal als Interferogramm 4 empfangen und aufgezeichnet. Dabei hat gegenüber dem am Ende der Entwicklungszeit  $t_1$  erscheinenden 90°-Impuls 2 die HF-Schwingung des ersten und des letzten 90°-Impulses die Phasenlage  $\psi_1$  bzw.  $\psi_2$ , während die phasenempfindliche Gleichrichtung des Interferogrammes 4 mit einem Hochfrequenzsignal der Phase  $\psi_1 + \psi_2$  erfolgt, wobei  $\psi_1$  und  $\psi_2$  abwechselnd die Werte 0 und  $\pi$  annehmen.

50 Nach der Erfindung wird zwischen die ersten beiden 90°-Impulse, welche die Entwicklungszeit  $t_1$  bestimmen, ein Zeitumkehr-Impuls oder TR-Impuls eingeschaltet, der bei dem dargestellten Ausführungsbeispiel aus zwei Abschnitten besteht, nämlich zwei 90°-Impulsen 5 und 6, die in einem zeitlichen Abstand  $\tau$  aufeinander folgen und jeweils von dem benachbarten 90°-Impuls 1 bzw. 2 den Abstand  $t_{1/2}$  haben. Die HF-Schwingung des ersten 90°-Impulses 5 hat den Phasenwinkel  $\beta_n + \varphi_g$ , während die HF-Schwingung des zweiten 90°-Impulses die Phasenlage  $\pi + \varphi_g$  hat. Die beiden 90°-Impulse 5, 6 haben die Wirkung eines Impulses, der eine Drehung der Spinnmomente um den Winkel  $\beta_n$  zur Folge hat und dessen Phasen um  $\varphi_g$  verschoben ist. Außerdem ist bei der in Fig. 1 dargestellten Impulsfolge der Phasenwinkel des ersten 90°-Impulses um  $\beta_n$  verschoben, so daß die HF-Schwingung dieses Impulses den Phasenwinkel  $\beta_n + \psi_1$  hat.

55 60 Der Phasenwinkel  $\beta_n$  ist bestimmt durch die angenommene maximale Anzahl  $N-1$  der Kopplungspartner jedes relevanten Kernspins in der Probe. Der Phasenwinkel  $\beta_n$  wird in Schritten  $\pi/N$  verändert, so daß für  $2N-1$  aufeinanderfolgende Anregungen gilt,

$$65 \quad \beta_n = \frac{\pi}{N}$$

mit  $n = 0, 1, 2, \dots, N-1, N+1, \dots, 2N-1$ .

Dieser Phasenzyklus für  $\beta_n$  wird unter Betrachtung der Mehrfach-Quanten-Kohärenzen (MQC) abgeleitet, die

von dem 90°-Impuls 5 mit der Phase  $\beta_n + \varphi_q$  des Zeitumkehr-Impulses erregt werden. Die Mehrfach-Quanten-Kohärenzen müssen in dem Verhältnis

$$B_p = \frac{(-1)^p}{12} \left( 3p^2 - K^2 - \frac{1}{2} \right)$$

kombinieren. In dieser Beziehung ist  $K$  die Zahl der höchsten tatsächlich vorliegenden MQC und  $p$  ein laufender Wert zwischen 0 und  $K$ .  $B_p$  ergibt das Gewicht für die Mehrfach-Quanten-Kohärenz der Ordnung  $p$ . Ist es erwünscht, J-Kopplungen oder Spins zu refokussieren, die  $K-1$  oder weniger J-Kopplungen aufweisen, muß die Phase  $\beta_n$  in Schritten von  $\pi/N$  erhöht werden, wobei  $N > K$ . Die Gewichtungsfaktoren für die individuellen Schritte des  $\beta$ -Zyklus werden durch eine Fourier-Transformation der Werte  $B_p$  erhalten, nämlich

$$W_n = \frac{1}{2} B_0 + \sum_{p=1}^K B_p \cos(p\beta_n) - \frac{1}{4} B_K \cos(K\beta_n) \delta K, N.$$

In der vorhergehenden Beziehung ist, wie bereits angegeben,  $n = 0, 1, 2, \dots, N-1, N+1, \dots, 2N-1$ . Für den empfindlichsten Fall  $N = K$  findet man

$$W_n = \frac{N}{8} (-1)^n \left[ \cos \left( \frac{n\pi}{2N} \right) \right]^2.$$

Berechnete Werte für die Phasenwinkel  $\beta_n$  und die zugeordneten Gewichtungsfaktoren  $W_n$  für  $N = K = 4$  sind in der folgenden Tabelle angegeben. Die Phase  $\varphi_q$  muß unabhängig davon die drei Werte 0,  $2\pi/3$  und  $4\pi/3$  durchlaufen.

| $\beta_n$ | 0     | $\pi/4$ | $\pi/2$ | $3\pi/4$ | $5\pi/4$ | $3\pi/2$ | $7\pi/4$ |
|-----------|-------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
| $W_n$     | 0,500 | -0,5860 | 1,000   | -3,414   | -3,414   | 1,000    | -0,586   |

Das den Zeitumkehr-Impuls bildende Impulspaar 5, 6 kann demnach auch als Mehrfach-Quantenfilter betrachtet werden. Der beschriebene Phasenzzyklus ist dann einer Kombination von  $p$ -Quanten-gefilterten Spektren mit den Faktoren

$$\frac{(-1)^p}{12} \left( 3p^2 - N^2 - \frac{1}{2} \right)$$

für  $0 < p < N$  äquivalent. Der beschriebene Phasenzzyklus für  $\beta_n$  selektiert die Kohärenz-Übertragungswege  $\Delta_p$ , von denen nur  $\Delta_p = 0$  zur Refokussierung der skalaren Kopplungen führt. Es ist daher erforderlich, den Anteil  $\Delta_p = 0$  durch einen zusätzlichen Phasenzzyklus des gesamten Zeitumkehr-Impulses zu selektieren. Hierzu dient der Dreischritt-Zyklus  $\varphi_q = 0, 2\pi/3, 4\pi/3$ .

Wie bereits erwähnt, gehören die Phasen  $\psi_1$  und  $\psi_2$  zu üblichen NOESY-Experimenten. Ihre zyklische Variation dient der Unterdrückung axialer Linien ( $\psi_1 = 0, \pi$ ) sowie der Ein-Quanten-Kohärenz während der Mischzeit  $\tau_m$  ( $\psi_2 = 0, \pi$ ). Die Null-Quantenunterdrückung, die bei der konventionellen NOE-Spektroskopie ein bekanntes Problem bildet, ist bei NOESY mit Zeitumkehr (NOESY-TR) infolge der Refokussierung der J-Kopplungen überflüssig. Es kann selbstverständlich die Methode der zeitproportionalen Phasenerhöhung (TPPI-Methode) in der üblichen Weise auf den ersten Impuls angewendet werden, um positive und negative Frequenzen zu trennen und reine 2D-Absorptionslinien zu erhalten.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß das NOESY-TR-Experiment auch gewisse Nachteile aufweist. Im Vergleich zum herkömmlichen NOESY tritt ein Empfindlichkeitsverlust um etwa den Faktor 2,5 ein, dessen genauer Wert von der Anzahl  $K$  der gekoppelten Spins abhängt. Weiterhin können unerwünschte Kreuzlinien in den Stellungen  $(\omega_1, \omega_2) = (1/2[\Omega_k + \Omega_l], \Omega_m)$  in Systemen gekoppelter Spins auftreten. Weiterhin kann der Spin  $I_m$  entweder zu dem gleichen Spinsystem wie  $I_k$  und  $I_l$  gehören oder eine Kreuzrelaxation bezüglich  $I_k$  oder  $I_l$  aufweisen. Diese Linien sind jedoch leicht von den gewünschten,  $\omega_1$ -entkoppelten Linien zu unterscheiden, weil sie bezüglich  $\omega_1$  eine gegenphasige Multiplettstruktur haben. Wenn erforderlich, können die unerwünschten Linien auch in einer Weise unterdrückt werden, welche der Unterdrückung der Null-Quanten-Kohärenz bei NOESY ähnlich ist.

Die Fig. 2 bis 4 veranschaulichen in deutlicher Weise die Wirkung des erfindungsgemäßen Verfahrens bei der Aufnahme eines 2D-NOE-Spektrogrammes von Deca-peptid-LHRH oder  $p$ -Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly<sup>6</sup>-Leu-Arg-Pro-Gly<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>. Das herkömmliche NOESY-Diagramm nach Fig. 2 zeigt in den beiden eingerahmten Bereichen 11, 12 starke Überlappungen der Kreuzlinien, welche eine Zuordnung dieser Linien behindern und eine quantitative Auswertung des NOE-Spektrogrammes unmöglich machen. In den Fig. 3a und 4a sind die Bereiche 11 und 12 in vergrößertem Maßstab nochmals wiedergegeben. Die durch die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens erzielte Entkopplung in der  $\omega_1$ -Richtung ergibt die in den Fig. 3b und 4b

wiedergegebenen 2D-Spektrogramme 13 bzw. 14. Ein Vergleich der Diagramme 11 und 13 bzw. 12 und 14 zeigt deutlich die Eliminierung der Linienauflösung in der  $\omega_1$ -Richtung, die nunmehr eine klare Identifikation der einzelnen Linien und damit eine einwandfreie Interpretation des Spektrogrammes ermöglicht. Die dargestellten Spektrogramme zeigen den Ausschnitt des NH—CaH-Bereiches eines 300 MHz NOE-Spektrums. Die Aufnahme erfolgte mit 700  $t_1$ -Abtastungen für eine mit Nullen aufgefüllte  $2K \times 2K$  Datenmatrix.

Die große Bedeutung des erfundengemäßen Verfahrens ergibt sich u. a. daraus, daß die quantitative Auswertung eines NOESY-Spektrums, d. h. die Messung der Signalamplituden der Kreuzlinien, eine direkte Information über atomare Abstände liefert. Diese Information ist von immenser Bedeutung für die Aufklärung der tertiären Strukturen von biologischen Makromolekülen. Eine solche quantitative Auswertung ist jedoch nicht möglich, wenn die Kreuzlinien im herkömmlichen NOESY-Spektrum überlappen. Das erfundengemäße NOESY-TR Verfahren stellt die bisher einzige Methode dar, wodurch die erwünschte Information auch bei sonst überlappenden Kreuzlinien gewonnen werden kann.

Wie bereits erwähnt, ist das erfundengemäße Verfahren nicht nur dazu geeignet, die Entwicklung bei einer J-Kopplung in Verbindung mit der 2D-NOE-Spektroskopie rückgängig zu machen, sondern sie ist auch für andere Zwecke einsetzbar. Tatsächlich kann der Zeitumkehr-Impuls mit den zugeordneten Phasenverschiebungen, kurz gesagt das TR-Element, in eine Vielzahl unterschiedlicher Impulsfolgen eingefügt werden, bei denen eine homo- oder heteronukleare Entkopplung erwünscht ist. Die Fig. 5 bis 10 geben Impulsfolgen wieder, wie sie bei anderen Experimenten Anwendung finden können.

Fig. 5 veranschaulicht allgemein eine Impulsfolge zur Beobachtung (homonuklearer) Austauschvorgänge, bei der zur Beobachtung der Austauschvorgänge einem  $90^\circ$ -Anregungsimpuls 21 eine Entwicklungszeit  $t_1$  folgt, bevor das Interferogramm 22 nach Einstrahlen eines Impulspaares 24, das einen bekannten Zwei-Quanten-Filter mit einem unabhängigen Phasenzyklus bildet, aufgenommen wird. Nach Ablauf der halben Entwicklungszeit  $t_1/2$  wird das TR-Element 23 eingeführt, das wiederum in der beschriebenen Weise aus zwei  $90^\circ$ -Anteilen mit den Phasenverschiebungen  $\beta_n + \varphi_q$  bzw.  $\pi + \varphi_q$  besteht. Entsprechend hat der dem TR-Element 23 vorausgehende  $90^\circ$ -Impuls 21 eine Phasenverschiebung  $\beta_n$ . Dieses Experiment liefert ein homonuklear J-korriiertes 2D-Spektrum ohne die sonst vorhandenen, informationslosen und störenden Diagonalsignale (unkorrierte Signale bei Frequenzen  $\omega_1 = \omega_2$ ).

Bei der J-korrierten 2D-Spektroskopie (COSY) wird am Ende der Entwicklungszeit  $t_1$ , die wiederum einem  $90^\circ$ -Anregungsimpuls 31 folgt, die Entwicklungszeit  $t_1$  nicht durch einen weiteren  $90^\circ$ -Impuls abgeschlossen, sondern es folgt nach einer Mischzeit  $\tau_m$  ein  $180^\circ$ -Impuls 32, an den sich nach Ablauf einer weiteren Mischzeit  $\tau_m$  ein weiterer  $90^\circ$ -Impuls 33 anschließt, auf den dann die Aufnahme des Interferogrammes 34 erfolgt. Auch hier wird wieder, wie in Fig. 6 dargestellt, erfundengemäß ein TR-Element 35 nach Ablauf der halben Entwicklungszeit  $t_1/2$  eingefügt. Ebenso wird dem dem TR-Element 35 vorausgehenden  $90^\circ$ -Impuls 31 wiederum die Phasenverschiebung  $\beta_n$  erteilt. Entsprechendes gilt auch für das total korrierte 2D-Spektrogramm (TOCSY) nach Fig. 7, bei dem lediglich während der Mischzeit  $\tau_m$  ein Sättigungsimpuls 36 eingestrahlt wird.

Fig. 8 zeigt das Diagramm der zur Aufnahme eines Mehrquanten-Spektrogrammes dienenden Impulsfolge. Auch hier wird wieder die Entwicklungszeit  $t_1$  durch einen ersten  $90^\circ$ -Impuls 41 eingeleitet und durch einen zweiten  $90^\circ$ -Impuls 42 abgeschlossen. Zum Unterschied zu den vorher besprochenen Impulsfolgen sind jedoch dem die Entwicklungszeit  $t_1$  einleitenden  $90^\circ$ -Impuls 41 ein weitere  $90^\circ$ -Impuls 43 und ein  $180^\circ$ -Impuls 44 vorgeschaltet. Die Aufnahme des Interferogrammes 45 folgt im Anschluß an den zweiten  $90^\circ$ -Impuls 42. Auch wird wieder erfundengemäß das TR-Element 46 nach der halben Entwicklungszeit  $t_1/2$  in die Impulsfolge eingefügt. In diesem Fall muß nicht nur dem die Entwicklungszeit einleitenden  $90^\circ$ -Impuls 41 eine Phasenverschiebung um  $\beta_n$  erteilt werden, sondern auch den anderen, dem TR-Element vorhergehenden Impulsen 43 und 44.

Endlich zeigen die Fig. 9 und 10 Impulsfolgen, wie sie bei der Untersuchung heteronuklearer Kopplungen und bei der indirekten Beobachtung der Kernspinresonanz Anwendung finden. Bei der in Fig. 9 dargestellten Impulsfolge werden die H-Spins der zu untersuchenden Probe durch zwei  $90^\circ$ -Impulse 51, 52 angeregt, die eine Entwicklungszeit  $t_1$  auslösen bzw. beenden. Zusammen mit dem zweiten  $90^\circ$ -Impuls 52 wird auch ein  $90^\circ$ -Impuls 53 für die mit den H-Atomen gekoppelten X-Atome des Spinsystems eingestrahlt. Bei diesen X-Atomen kann es sich beispielsweise um Kohlenstoff-13 handeln. Das nach einem Zeitintervall  $\tau'$  aufgenommene Interferogramm 54 der X-Atome zeigt an, in welchem Maße die X-Atome während der Entwicklungszeit  $t_1$  durch heteronukleare Kopplung von den zuvor angeregten H-Atomen angeregt worden sind. Auch hier wird wieder nach der Erfindung das TR-Element 55 zwischen die beiden die Entwicklungszeit  $t_1$  definierenden  $90^\circ$ -Impulse 51, 52 eingefügt und es wird die Phase des ersten  $90^\circ$ -Impulses 51 in der beschriebenen Weise abgeändert. Das Zeitintervall  $\tau'$  mit  $180^\circ$ -Impulsen 56, 57 in seiner Mitte dient wie üblich zur Refokussierung der Antiphasen-Signale vor dem Einschalten des Entkopplers 58.

Bei der in Fig. 10 dargestellten indirekten Spektroskopie werden die beiden Atomarten H und X im zeitlichen Abstand einer Mischzeit  $\tau_m$  durch je einen  $90^\circ$ -Impuls 61 bzw. 62 angeregt. Dem zeitlich späteren  $90^\circ$ -Impuls, der zur Anregung der X-Atome diente, folgt ein weiterer  $90^\circ$ -Impuls 63 nach der Entwicklungszeit  $t_1$ , wogegen die zuerst angeregte Atomart H mit einem  $180^\circ$ -Impuls 64 bestrahlt wird, welcher dem ersten  $90^\circ$ -Impuls nach einer Zeit  $\tau_m + t_1/2$  folgt. Normalerweise würde bei der indirekten Spektroskopie die Beobachtung der ersten Atomart H im Zeitpunkt  $t_1/2 + \tau_m$  nach dem  $180^\circ$ -Impuls 64 folgen. Bei Anwendung des erfundengemäßen Verfahrens wird jedoch zur Zeit  $t_1/2$  nach dem  $180^\circ$ -Impuls 64 das TR-Element 65 eingefügt, das demnach zeitlich mit dem das Zeitintervall  $t_1$  beendenden  $90^\circ$ -Impuls 63 zusammenfällt, der auf die andere Atomart X eingestrahlt wird. Diesem TR-Element 65 folgt im zeitlichen Abstand  $\tau_m + t_1/2$  ein weiterer  $180^\circ$ -Impuls 66. Die Aufnahme des Interferogrammes 67 erfolgt für die erste Atomart H zur Zeit  $t_1/2$  nach dem Einstrahlen des letzten  $180^\circ$ -Impulses 66. Betrachtet man hier die Summe der Zeiten

$$\tau_m + t_1/2 + t_1/2 + \tau_m + t_1/2 + t_1/2 = 2(t_1 + \tau_m)$$

als Gesamtentwicklungszeit von dem ersten  $90^\circ$ -Anregungsimpuls 61 bis zur Aufnahme des Interferogrammes 67, so ist ersichtlich, daß das TR-Element 65 wieder in die Mitte der Gesamtentwicklungszeit fällt, da sein zeitlicher Abstand von dem  $90^\circ$ -Anregungsimpuls 61 den Betrag  $\tau_m + t_1$  hat. Auch hier versteht es sich, daß die beiden dem TR-Element 65 vorausgehenden  $90^\circ$ - und  $180^\circ$ -Impulse 61 bzw. 64 eine um den Phasenwinkel  $\beta_n$  verschobene Phase der HF-Schwingung aufweisen.

Die vorstehenden Beispiele zeigen, daß das Prinzip der Erfindung bei vielen bekannten Impulsgruppen Anwendung finden kann, mit denen Spinsysteme zum Zwecke der Aufzeichnung von Spektrogrammen und insbesondere von 2D-Spektrogrammen anregbar sind. Dabei kann das TR-Element insbesondere eingefügt werden, um eine  $\omega_1$ -Entkopplung bei allen homo- oder heteronuklearen 2D-Experimenten zu erzielen, bei denen die Komponenten, die in bezug auf die homonuklearen Kopplungen in Phase sind, am Ende der Entwicklungszeit ausgewählt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich mit allen Kernspinresonanzspektrometern durchführen, die einen Generator zur Erzeugung von aufeinanderfolgenden HF-Impulsen mit einstellbaren zeitlichen Abständen sowie mit einer einstellbaren Phasenlage der HF-Schwingung gegenüber einer kohärenten Bezugsschwingung aufweist, d. h. mit allen modernen Puls-Fourier-Transform-Spektrometern.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Aufnahme der Kernspinresonanzspektren von molekularen Spinsystemen, zwischen denen eine Wechselwirkung stattfindet, bei dem die Spinsysteme durch einen  $90^\circ$ -Impuls angeregt werden und die Beobachtung der Resonanzsignale der angeregten Spinsysteme erst nach Ablauf einer auf den  $90^\circ$ -Impuls folgenden Entwicklungszeit  $t_1$  stattfindet, dadurch gekennzeichnet, daß das Spinsystem nach Ablauf der halben Entwicklungszeit  $t_1/2$  mit einem Zeitumkehr-Impuls bestrahlt wird, der eine Drehung der Spinmomente um einen Flipwinkel  $\beta_n$  bewirkt und dessen HF-Schwingung gegenüber einer Referenzphasenlage eine Phasenverschiebung  $\varphi_q$  aufweist, wogegen die HF-Schwingung des dem Zeitumkehr-Impuls vorausgehenden  $90^\circ$ -Impulses oder auch weiterer, vor dem Zeitumkehr-Impuls verwendeter HF-Anregungsimpulse gegenüber der Referenzphasenlage eine Phasenverschiebung um einen Winkel  $\psi + \beta_n$  aufweist, in dem  $\psi$  entweder 0 oder  $\pi$  bedeutet und  $\beta_n$  mit dem Flipwinkel des Zeitumkehr-Impulses übereinstimmt und durch die maximale Anzahl  $N$  der im Spinsystem miteinander gekoppelten Spins gemäß der Gleichung

$$\beta_n = n \frac{\tau}{N}$$

mit  $n = 0, 1, 2, \dots, N-1, N+1, \dots, 2N-1$  bestimmt ist, wogegen  $\varphi_q$  unabhängig von  $\beta_n$  nacheinander einen der Werte

$$\varphi_q = q \frac{2\pi}{3}$$

mit  $q = 0, 1, 2$  annimmt, daß aufgrund von  $3(2N-1)$  Anregungen Resonanzsignale  $s_{nq}$  für jeden Wert von  $\beta_n$  und  $\varphi_q$  aufgenommen werden, und daß diese Resonanzsignale  $s_{nq}$  mit einem Gewichtungsfaktor

$$W_n = \frac{1}{2} B_o + \sum_{p=1}^K B_p \cos(p\beta_n) - \frac{1}{4} B_K \cos(K\beta_n) \delta_{K,N}$$

multipliziert und zu einem resultierenden Signal

$$S = \sum_{n=0}^{2N-1} \left( W_n \cdot \sum_{q=0}^2 s_{nq} \right)$$

addiert werden, wobei der Gewichtungsfaktor  $W_n$  die Fourier-Transformierte der Faktoren

$$B_p = \frac{(-1)^p}{12} \left( 3p^2 - K^2 - \frac{1}{2} \right)$$

ist, in denen  $K$  die höchste Anzahl der tatsächlich im Spinsystem vorkommenden Kopplungen angibt und  $p$  eine sich zwischen 0 und  $K$  fortlaufend ändernde, ganze Zahl ist, weshalb gilt:

$$B_o = \frac{-(2K^2 + 1)}{24} \text{ und } B_K = (-1) \frac{K(4K^2 - 1)}{24},$$

während  $\delta_{K,N}$  den Wert 1 hat, wenn  $N = K$ , und sonst null ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Zeitumkehr-Impuls einen ersten Abschnitt in Form eines  $90^\circ$ -Impulses mit der Phase  $\beta_n + \varphi_q$  und einen dem ersten Abschnitt falls gerätebedingt erforderlich mit einem gegenüber der Entwicklungszeit  $t_1$  kurzen zeitlichen Abstand  $\tau$ , der ausschließlich der Phaseneinstellung dient, folgenden zweiten Abschnitt in Form eines  $90^\circ$ -Impulses mit der Phase  $\pi + \varphi_q$  aufweist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet durch die Verwendung von zur Aufnahme von zweidimensionalen Kernspinresonanzspektren geeigneten Impulsfolgen mit eingefügtem Zeitumkehr-Impuls und um den Winkel  $\beta_n$  verschobener Phase der HF-Schwingung der dem Zeitumkehr-Impuls, vorausgehenden HF-Anregungsimpulse.

4. Verfahren nach Anspruch 3, gekennzeichnet durch die Verwendung der Impulsfolge

$$90^\circ(\beta_n + \psi_1) - \frac{1}{2} t_1 - 90^\circ(\beta_n + \varphi_q) - \tau - 90^\circ(\pi + \varphi_q) - \frac{1}{2} t_1 - 90^\circ \\ (0) - \tau_m - 90^\circ(\psi_2) - \text{acq.}(\psi_1 + \psi_2)$$

mit  $\psi_1, \psi_2 = 0, \pi$  in einem von  $\beta_n$  und  $\varphi_q$  unabhängigen zyklischen Wechsel und einer variablen Mischzeit  $\tau_m$  für NOESY-Experimente.

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß zur Untersuchung von Spinsystemen mit heteronuklearer Kopplung mittels einer ersten Impulsfolge eine erste Kernspinart unmittelbar angeregt und dann durch eine zweite Impulsfolge die durch Kopplung erfolgte Anregung einer zweiten Kernspinart abgefragt wird, und daß der Zeitumkehr-Impuls in die erste Impulsfolge eingefügt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß zur indirekten Untersuchung von Spinsystemen mit heteronuklearer Kopplung mittels einer ersten Impulsfolge eine erste Kernspinart und mittels einer zweiten Impulsfolge eine zweite Kernspinart in der Weise angeregt wird, daß ein einem ersten  $90^\circ$ -Impuls der ersten Impulsfolge folgender erster  $180^\circ$ -Impuls in die Mitte zwischen zwei  $90^\circ$ -Impulsen der zweiten Impulsfolge fällt, daß der Zeitumkehrimpuls in die erste Impulsfolge an einer Stelle eingefügt ist, die zeitlich mit dem zweiten  $90^\circ$ -Impuls der zweiten Impulsfolge zusammenfällt, daß dem Zeitumkehr-Impuls in der ersten Impulsfolge ein weiterer  $180^\circ$ -Impuls in einem zeitlichen Abstand folgt, der dem Abstand des ersten  $180^\circ$ -Impulses von dem ersten  $90^\circ$ -Impuls der ersten Impulsfolge gleich ist, und daß die Aufnahme des von der ersten Kernspinart gelieferten Resonanzsignals in einem zeitlichen Abstand vom weiteren  $180^\circ$ -Impuls beginnt, der gleich dem zeitlichen Abstand des Zeitumkehr-Impulses von dem ersten  $180^\circ$ -Impuls ist, so daß der Zeitumkehr-Impuls in die Mitte zwischen den ersten  $90^\circ$ -Impulsen der ersten Impulsfolge und den Beginn der Signalaufnahme fällt.

35 Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

ZEICHNUNGEN SEITE 2

Nummer: DE 35 43 123 C2  
Int. Cl. 5: G 01 N 24/08  
Veröffentlichungstag: 3. Mai 1990

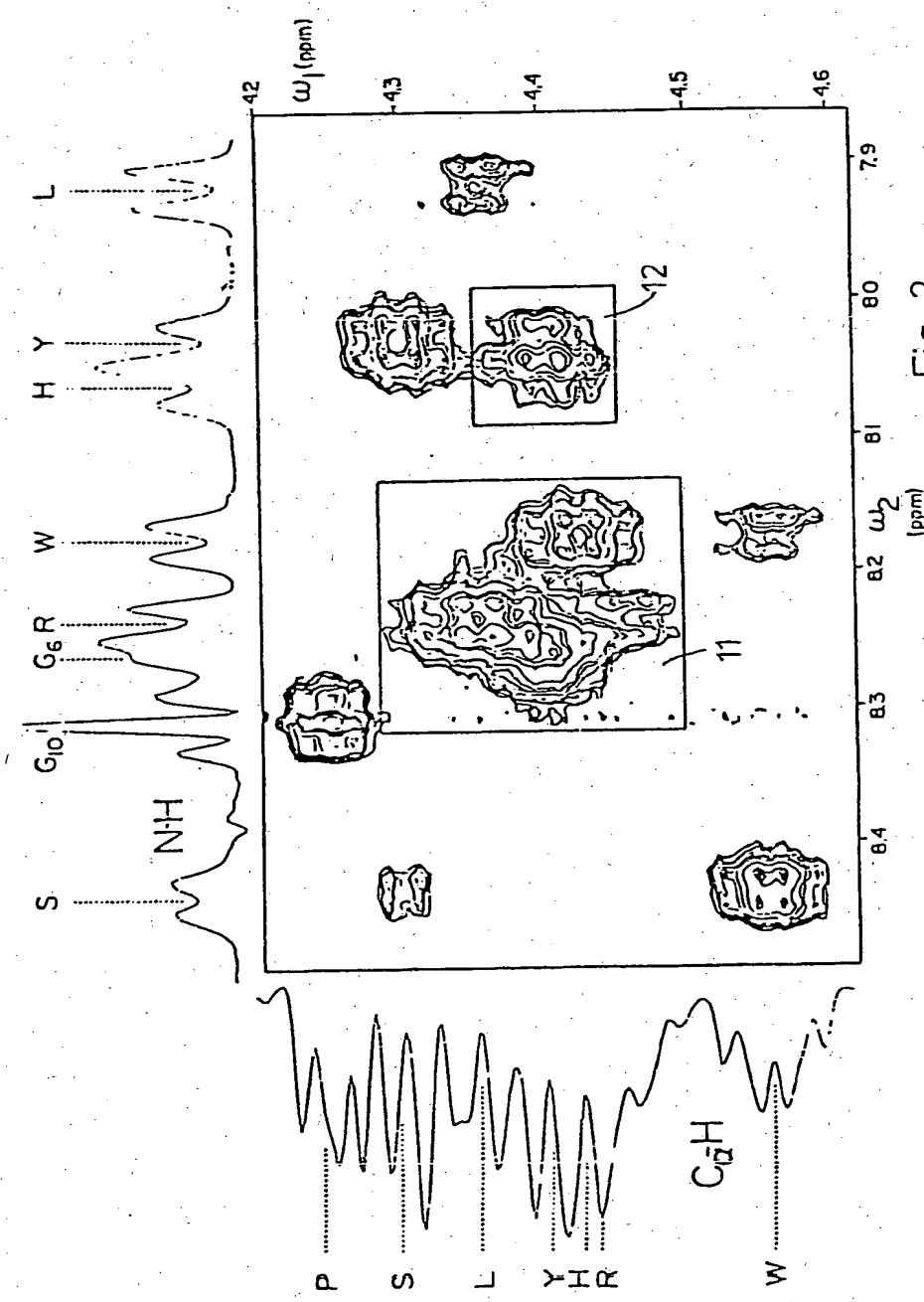


Fig. 2

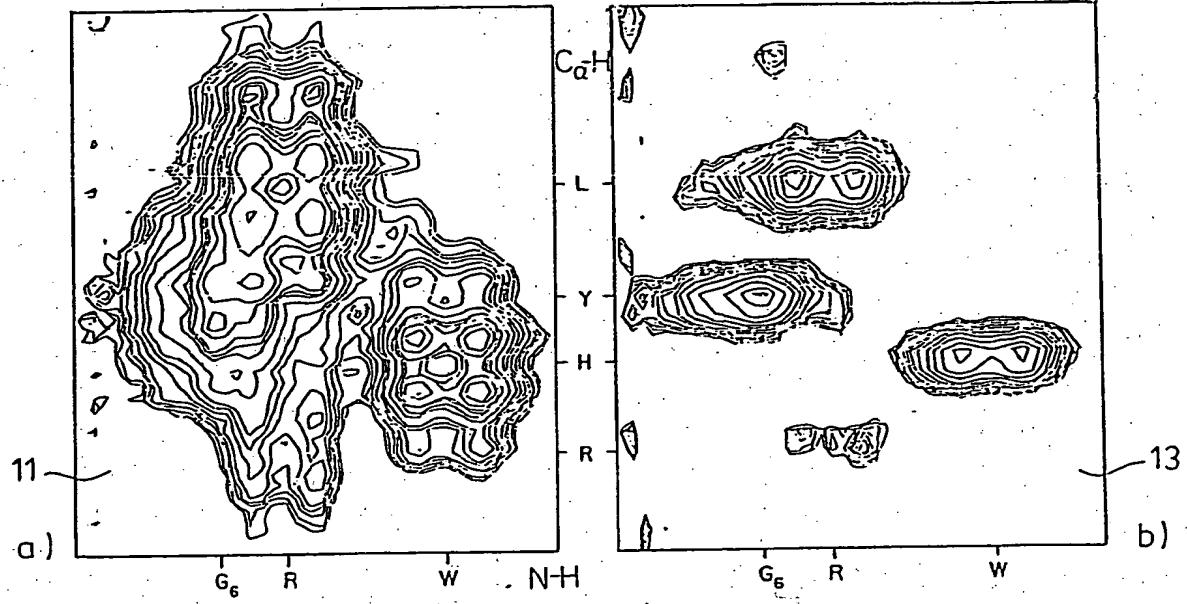


Fig. 3

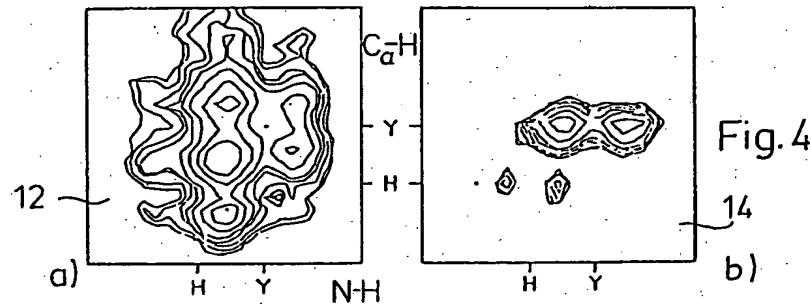


Fig. 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)